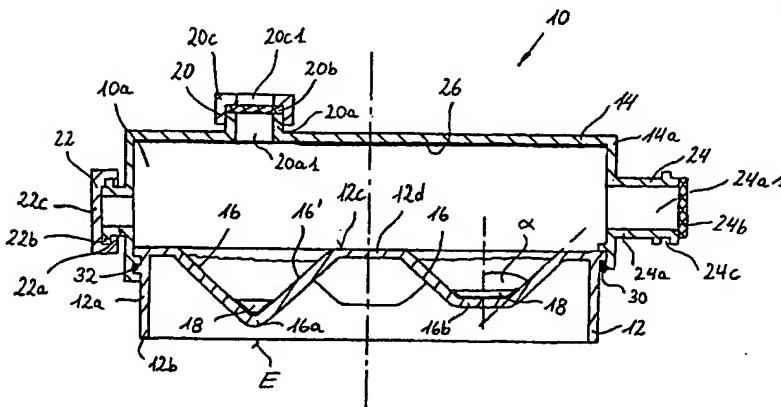


(54) Title: RECEPTACLE FOR CELL CULTURES AND USE OF MULTIPLE DISHES FOR CULTURING ANTITUMOUR CELLS

(54) Bezeichnung: ZELLKULTURGEFÄSS UND VERWENDUNG VON MULTISCHALEN ZUR ZÜCHTUNG VON ANTITUMORZELLEN

The invention relates to a receptacle for cell cultures (10) used to culture an antitumour cell transplant for gene and cell therapy. Said receptacle comprises a base part (12) with a plurality of support points (12b), which form a support plane (E) for supporting the cell culture receptacle (10) on a substantially level lower surface. Said receptacle further comprises an upper surface (12c), which runs substantially parallel to the support plane (E) and has a plurality of culturing recesses (16), and a lid (14) for covering the base part (12). At least one culturing recess (16) of the cell culture receptacle (12) progressively narrows from the upper surface (12c) of the base part (12) towards the bottom of the recess (16a, 16b), i.e. the cross-sectional surface area of said recess (16) decreases from the upper surface (12c) of the base part (12) towards the bottom (16a, 16b) in such a way that the cells, during multiplication, can expand not only upwards but also sideways. Each culturing recess (16) has a volume of at least 1 ml. In addition, the base part (12) and lid (14) are connected such that they are liquid proof.



(57) Zusammenfassung

Ein Zellkulturgefäß (10) zum Züchten eines Anti-Tumor-Zellen-Transplantats für die Gen- und Zelltherapie, umfaßt ein Basisteil (12) mit einer Mehrzahl von Stützstellen (12b), welche eine Stützebene (E) zum Abstützen des Zellkulturgefäßes (10) auf einen im wesentlichen planen Untergrund aufspannen, sowie mit einer zur Stützebene (E) im wesentlichen parallel verlaufenden oberen Fläche (12c), in der eine Mehrzahl von Züchtungsvertiefungen (16) ausgebildet ist, und einen Deckel (14) zum Abdecken des Basisteils (12). Wenigstens eine Züchtungsvertiefung (16) dieses Zellkulturgefäßes (12) verjüngt sich von der oberen Fläche (12c) des Basisteils (12) zum Vertiefungsboden (16a, 16b) hin, d.h. daß die Querschnittsfläche dieser wenigstens einen Vertiefung (16) nimmt von der oberen Fläche (12c) des Basisteils (12) zum Boden (16a, 16b) hin derart ab, daß sich die Zellen bei ihrer Vermehrung nicht nur nach oben, sondern auch in Querrichtung ausbreiten können. Jede der Züchtungsvertiefungen (16) weist ein Volumen von wenigstens 1 ml auf. Ferner sind das Basisteil (12) und der Deckel (14) flüssigkeitsdicht miteinander verbindbar.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

**Zellkulturgefäß
und
Verwendung von Multischalen zur Züchtung von Antitumorzellen**

5

Beschreibung

10 Die Erfindung betrifft ein Zellkulturgefäß zum Züchten eines Antitumor-
zellen-Transplantats für die Gen- und Zelltherapie, umfassend ein Basisteil
mit einer Mehrzahl von Stützstellen, welche eine Stützebene zum Abstützen
des Zellkulturgefäßes auf einem im wesentlichen planen Untergrund auf-
spannen, sowie mit einer zur Stützebene im wesentlichen parallel ver-
15 laufenden oberen Fläche, in der eine Mehrzahl von Züchtungsvertiefungen
ausgebildet sind, und ferner umfassend einen Deckel zum Abdecken des
Basisteils.

Die Stützstellen können dabei beispielsweise von einer Mehrzahl gesonder-
20 ter Stützansätze des Basisteils gebildet sein. Ferner ist es möglich, daß die
Stützstellen Teil eines umlaufenden Stützrandes oder einer unteren Begren-
zungsfläche des Basisteils sind.

Bei der Züchtung eines Transplantats für die Tumorbekämpfung kann bei-
25 spielsweise wie folgt vorgegangen werden:

Man entnimmt dem Patienten eine Blutprobe. In dieser befinden sich in
geringer Anzahl (bspw. 10.000) auch auf Zellen des zu bekämpfenden
Tumors spezifisch ansprechende Abwehrzellen, sogenannte Anti-Tumor-
30 Zellen.

Bei der Züchtung des Anti-Tumor-Transplantats gilt es nun, diese geringe
Anzahl von Anti-Tumor-Zellen spezifisch zu stimulieren und in großem

Maßstab selektiv zu vermehren. Das Wachstum der Anti-Tumor-Zellen kann beispielsweise dadurch stimuliert werden, daß man sie mit ganzen Tumorzellen oder sogenannten Vesikeln der Tumorzellen in Kontakt bringt.

5 Zum Erhalt von Tumorzellen entnimmt man dem Patienten Tumorgewebe. Die Tumorzellen von z.B. soliden Tumoren werden mit Hilfe an sich bekannter Verfahren, bspw. unter Einsatz von Enzymen, vereinzelt. Durch Lyse der Tumorzellen und anschließendem Filtrieren wird die Erbinformation entfernt, so daß man nur noch die Zellmembranen oder Bruchstücke dieser Zellmembranen zurückbehält, nämlich die vorstehend angesprochenen Vesikel.
10 Diese Vesikel tragen zwar immer noch die für Tumorzellen charakteristischen Oberflächenmerkmale, so daß sie von Abwehrzellen als Tumorzellen erkannt werden können. Sie können jedoch auf ihre Umgebung, bspw. die Abwehrzellen, nicht mehr durch Abgabe von Hormonen oder dergleichen einwirken, so daß sie die Arbeit des Immunsystems nicht behindern können. Ferner können sie sich nicht mehr vermehren, so daß sie nach der
15 Injektion des Anti-Tumor-Transplantats in den Patienten nicht der Bildung von Metastasen Vorschub leisten können.

20 Die so gewonnenen Tumorzellen oder Tumorzellvesikel kann man zur Stimulation des Wachstums der Anti-Tumor-Zellen in einer Nährlösung enthaltenden Zuchtungsgefäß mit der vorbehandelten Blutprobe zusammenführen. Nach einer ersten Expansion der Anti-Tumor-Zellen müssen die Zellen portioniert und mit frischer Nährlösung auf mehrere Zuchtungsgefäße
25 oder mehrere Zuchtaufnahmen ein und desselben Zuchtungsgefäßes verteilt werden.

Haben sich die Anti-Tumor-Zellen in ausreichendem Maße vermehrt, so können sie durch einen Selektionsschritt weitgehend vom Hintergrund unerwünschter, unspezifischer Zellen getrennt werden. Hierzu markiert man
30 die Anti-Tumor-Zellen bspw. mit Hilfe von Retroviren, welche zur Expression eines Selektionsmarkers führen, z.B. neomycin- oder I-NGFR-Gen

(I-NGFR - niederaffiner NGF-Rezeptor - low affinity nerve growth factor receptor). An die Separation kann sich ein erneuter Expansionsschritt anschließen, wobei die Anti-Tumor-Zellen wiederum portioniert und auf eine Mehrzahl von Zuchtungsgefäßen bzw. -aufnahmen verteilt werden müssen.

5

Auf diese Weise kann aus anfänglich bspw. etwa 10.000 Anti-Tumor-Zellen in der vorbehandelten Blutprobe ein Anti-Tumor-Transplantat von etwa 10^7 bis 10^8 Anti-Tumor-Zellen in einem Volumen von 50 bis 100 ml erhalten werden.

10

Das vorstehend beschriebene beispielhafte Züchtungsverfahren wirft - wie andere vergleichbare Züchtungsverfahren auch - in der Praxis verschiedene Probleme auf:

15

Im Hinblick auf die Gefahr einer Kontamination der Zellenkultur, deren Gefahr nicht nur im Absterben der Kultur, sondern insbesondere in einer Infektion des Patienten liegt, birgt jeder Zugriff von außen auf die Zellkultur ein nicht bzw. nur schlecht zu kalkulierendes Risiko. Bei dem vorstehend beschriebenen herkömmlichen Verfahren sind insbesondere bei der wieder-

20

holten Portionierung der expandierten Anti-Tumor-Zellen zahlreiche derartige Eingriffe erforderlich.

25

Im Hinblick auf das vorstehend diskutierte Problem werden in der Praxis daher ausschließlich relativ großvolumige Zuchtungsgefäße bzw. Zuchtungsgefäße mit relativ großvolumigen Züchtungsaufnahmen verwendet, da nur diese bei einer minimalen Zahl von Portionierungsschritten das erforderliche Transplantatsvolumen zu erhalten gestatten. Derartige Zuchtungsgefäße sind beispielsweise Kulturschalen mit einer Mehrzahl von typischerweise vier bis sechs relativ großvolumigen Züchtungsvertiefungen,

30

von denen die vorliegende Erfindung im Oberbegriff des Anspruchs 1 ausgeht.

Die Vertiefungen der gattungsbildenden Multischalen haben einen ebenen Boden und daran im wesentlichen orthogonal anschließende Begrenzungswände. Andererseits sind die bekannten, sich verjüngenden Multischalen ausschließlich für diagnostische Anwendungen konzipiert (Terasaki-Platten).

5 Einschränkend gilt für letztere Systeme, daß das pro Vertiefung applizierbare Volumen für Zellkulturmedium deutlich unter 1 ml liegt. Multischalen mit im wesentlichen orthogonalem Begrenzungswänden bedingen nach dem Einbringen der vorbehandelten Blutprobe bzw. einer zuvor portionierten Zellkultur eine relativ geringe anfängliche Dichte der Anti-Tumor-Zellen in
10 der jeweiligen Züchtungsvertiefung.

Die Wachstumsrate von Anti-Tumor-Zellen hängt nun aber unter anderem von der Dichte dieser Zellen in der Züchtungsvertiefung ab. Kritisch ist hier jedoch nicht nur eine zu hohe Zellendichte, sondern auch eine zu geringe
15 Zellendichte, so daß das Anwachsen der Zellen bei den herkömmlichen Multischalen relativ lange dauert. Dies hat insbesondere aufgrund der mehrfachen Portionierung der Zellkultur eine entsprechend geringere Effizienz des Züchtungsverfahrens zur Folge.

20 Aus der US 5,229,163 ist eine für diagnostische Zwecke konzipierte Mikrotiter-Platte bekannt. Die DE 29 02 026 B2 offenbart Multiwell-Platte, die für Testzwecke und Zellkulturen im kleinen Maßstab ausgelegt ist. Auch bei den aus der JP 08 131 153 A bekannten Aufnahmen geht es um diagnostische Probleme, nämlich um die Bestimmung der Cytotoxizität von Chemika-
25 lien. Die EP 0 589 634 A1 befaßt sich mit der Detektion von Mikroorganismen in Proben. Aus der US 5,288,638 ist eine Kulturflasche bekannt, die ein einziges großes Volumen umfaßt und zur Durchführung mikrobiologischer Tests von unter Druck stehenden Flüssigkeiten dient. Schließlich offenbart die US 5,462,874 eine spezielle Multiwell-Platte, deren Züch-
30 tungstiefungen im wesentlichen orthogonale Begrenzungswandungen aufweisen und somit für die in der vorliegenden Anmeldung diskutierte Züchtung eines Anti-Tumor-Zellen-Transplantats nicht in Betracht kommen.

Im Hinblick auf die vorstehend diskutierten Nachteile des Standes der Technik ist es Aufgabe der Erfindung, ein Kulturgefäß bereitzustellen, welches eine Reduzierung sowohl der zum Anwachsen der Zellkultur erforderlichen Zeitdauer als auch des Risikos einer Verunreinigung der Zellkultur ermöglicht.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß von einem Zellkulturgefäß der eingangs angegebenen Art gelöst, bei welchem sich wenigstens eine Züchtungsvertiefung von der oberen Fläche des Basisteils zum Vertiefungsboden hin verjüngt, d.h. bei welchem die Querschnittsfläche dieser wenigstens einen Vertiefung von der oberen Fläche des Basisteils zum Boden hin abnimmt, und bei welchem darüber hinaus das Basisteil und der Deckel flüssigkeitsdicht miteinander verbindbar sind.

Zur Züchtung des Zelltransplantats können die Anti-Tumor-Zellen zunächst nur in eine sich verjüngende Züchtungsvertiefung des mit Nährlösung gefüllten Zellkulturgefäßes eingebracht werden. Die Zellen rutschen schwerkraftbedingt an den Wandungen der Vertiefung entlang zu deren Boden, wo sie aufgrund der sich verjüngenden Struktur der Vertiefung in einer ihr Anwachsen begünstigenden Dichte beieinander liegen. Bei ihrer Vermehrung können sich die Zellen in der Züchtungsvertiefung nicht nur nach oben, sondern auch in Querrichtung ausbreiten. Dies verhindert, daß sie frühzeitig eine ihre weitere Vermehrung behindernde Dichte erreichen.

Nach erfolgter initialer Expansion der Zellkultur hin zu einer kritischen hohen Zelldichte kann die Portionierung allein durch Schütteln des Zellkulturgefäßes erfolgen. Hierbei vermischt sich die in der bzw. den anderen Züchtungsvertiefungen aufgenommene Nährlösung mit der die anfängliche Zellkultur enthaltenden Nährlösung. Stellt man das Züchtungsgefäß nun in den Züchtungsschrank zurück, so verteilt sich die Nährlösung und mit ihr auch die gezüchteten Anti-Tumor-Zellen auf die Mehrzahl von Züchtungsvertiefungen. Es ist somit kein Eingriff von außen erforderlich, so daß bei dem

erfindungsgemäßen Zellkulturgefäß auch die mit einem derartigen Eingriff verbundene Gefahr einer Kontamination der Zellkultur nicht besteht.

5 Zur Erzielung einer das Anwachsen der Zellen nach erfolgter Portionierung begünstigenden Zellendichte auf dem Boden der Züchtungsvertiefungen, können die Bodenflächen der Züchtungsvertiefungen unterschiedlich groß bemessen sein. Vorzugsweise können die andere Züchtungsvertiefung bzw. die anderen Züchtungsvertiefungen eine größere Bodenfläche aufweisen als die der ersten Expansion dienende Züchtungsvertiefung. Ferner können alle
10 oder zumindest einige Züchtungsvertiefungen sich zu ihrem Boden hin verjüngend ausgebildet sein.

Um den Zellen bei der Vermehrung stets eine Ausbreitung auch in Querrichtung ermöglichen zu können, ist vorgesehen, daß die Querschnittsfläche
15 der Vertiefungen zumindest über einen Teil der Höhe der Vertiefungen zum Boden hin monoton abnimmt. Die Vermehrung behindernde Ecken können bspw. dadurch vermieden werden, daß die Querschnittsfläche ferner stetig abnimmt.

20 Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform sind die Vertiefungen konisch oder kegelstumpfförmig ausgebildet. Der halbe Öffnungswinkel des Kegels beträgt dabei vorzugsweise zwischen etwa 30° und etwa 70°. Die Vertiefungen können jedoch auch eine andere Gestalt aufweisen und bspw. halbkugelförmig ausgebildet sein. Ferner kann sich an die konische bzw.
25 kegelstumpf-förmige Fläche bspw. eine Zylinderfläche anschließen.

Im Hinblick auf die vorstehend angesprochene Ermöglichung der Ausbreitung auch in Querrichtung ist es selbstverständlich auch bei anderen Ausführungsformen, beispielsweise Ausführungsformen mit pyramiden- oder
30 pyramidenstumpf-artigen Vertiefungen, bevorzugt, wenn der Winkel, den die Schrägfläche mit der Vertikalen einschließt, zwischen etwa 30° und etwa 70° beträgt.

Zur Begünstigung der Zellvermehrung kann wenigstens eine der Vertiefungen zumindest teilweise, vorzugsweise im Bereich ihres Bodens, mit wenigstens einem die Zellvermehrung begünstigenden Stoff beschichtet sein. Diese Beschichtung kann beispielsweise die vorstehend angesprochenen
5 Tumorzellvesikel und/oder andere die Expansion der Anti-Tumor-Zellen begünstigende Stimulatoren umfassen. Und auch die Innenfläche des Deckels kann mit wenigstens einem die Zellvermehrung begünstigenden Stoff beschichtet sein.

10 Eine Möglichkeit der Verbindung von Basisteil und Deckel besteht darin, diese Teile stoffschlüssig miteinander zu verbinden, bspw. durch Verkleben, Verschweißen oder dergleichen. Diese beispielsweise bereits bei der Fertigung erfolgende dauerhafte Verbindung von Deckel und Basisteil ist insbesondere im Hinblick auf die Gefahr einer Kontamination der Umgebung
15 von Vorteil.

Grundsätzlich ist jedoch auch möglich, daß der Deckel mit dem Basisteil verschraubbar ist, da dies die gewünschte Dichtungswirkung in besonders einfacher Weise zu erzielen erlaubt. Eine weitere Möglichkeit besteht darin,
20 daß der Deckel an dem Basisteil festspannbar ist, wobei hierunter auch eine Klemmverbindung nach Art eines Tupperware^(R)-Gefäßes verstanden werden soll.

Das erfindungsgemäße Zellkulturgefäß kann beispielsweise in Draufsicht
25 kreisförmig ausgebildet sein. Es ist jedoch auch möglich quadratische oder rechteckige Zellkulturgefäße zu verwenden.

Um gewünschtenfalls auf den Innenraum des Zellkulturgefäßes zugreifen zu können, beispielsweise um verbrauchte Nährlösung durch frische Nährlösung
30 ersetzen zu können oder um Gentransfersysteme wie bspw. Retroviren zum Markieren der Anti-Tumor-Zellen zugeben zu können oder dergleichen mehr, wird in Weiterbildung der Erfindung vorgeschlagen, daß das

Basisteil oder/und der Deckel wenigstens eine Zugangsstelle, vorzugsweise mehrere Zugangsstellen, zum Zugeben bzw. zum Entnehmen von Stoffen in das Gefäß bzw. aus dem Gefäß aufweist. Diese Zugangsstelle kann beispielsweise eine Öffnung aufweisen, welche mittels einer aus Gummimaterial bzw. gummi-artigem Material gebildeten Membrane verschlossen ist. Derartig ausgebildete Zugangsstellen sind beispielsweise von Flaschen bekannt, aus welchen mit einer Spritze Flüssigkeit entnommen wird. Sie haben den Vorteil einer geringen Gefahr der Kontamination des Flascheninhalts. Vor dem Durchstechen mit der Spritzennadel wird die Membrane bspw. mit Alkohol desinfiziert. Beim Herausziehen der Spritzennadel aus der Flasche verschließt sich die Membrane aufgrund ihrer Gummielastizität selbsttätig und verhindert so den Eintritt von Verunreinigungen.

Um beispielsweise das Absaugen oder Abgießen der Anti-Tumor-Zellen zu ermöglichen, kann die Zugangsstelle eine mittels eines Schraubverschlusses verschließbare Öffnung aufweisen. Zur Erleichterung des Abgießens sowie zur Sicherstellung einer praktisch vollständigen Entleerung des Zellkulturgefäßes wird ferner vorgeschlagen, daß der Deckel alleine oder das Basisteil alleine oder Deckel und Basisteil gemeinsam einen trichter-artig zusammenlaufenden Wandungsbereich festlegen, dessen Mündungsöffnung die Zugangsstelle zugeordnet ist.

In Weiterbildung der Erfindung wird vorgeschlagen, daß der Deckel oder/und das Basisteil wenigstens eine Anschlußstelle für weitere Behandlungsgeräte aufweist. Ein derartiges weiteres Behandlungsgerät kann beispielsweise eine Separationssäule sein, die nach ausreichender Zellvermehrung zum Abtrennen der Anti-Tumor-Zellen vom Störhintergrund unerwünschter, unspezifischer Zellen verwendet wird. Dabei kann das erfindungsgemäße Zellkulturgefäß sowohl das die Zellkultur an die Separationssäule abgebende Gefäß als auch das die abgetrennten Anti-Tumor-Zellen zur weiteren Vermehrung aufnehmende Gefäß sein.

Zur Verbindung des erfindungsgemäßen Zellkulturgefäßes mit anderen Vorrichtungen, beispielsweise der Separationssäule, können sowohl starre als auch schlauchartig flexible Verbindungselemente verwendet werden.

5 Zur Minimierung des Kontaminationsrisikos wird hierbei ferner vorgeschlagen, daß die Anschlußstelle eine mittels einer Membrane verschlossene Öffnung aufweist und derart ausgebildet ist, daß die Membran beim Anschließen des weiteren Behandlungsgeräts erst nach Herstellung einer zur Umgebung hin flüssigkeitsdichten Verbindung zwischen dem Zellkulturgefäß und dem weiteren Behandlungsgerät zerstört wird.

Um ein "Atmen" der Zellen bei der Vermehrung ermöglichen zu können ist vorgesehen, daß das Zellkulturgefäß gaspermeabel ausgebildet ist. Hierzu kann es beispielsweise wenigstens eine mittels einer gaspermeablen Membrane verschlossene Öffnung aufweisen.

Die Kosten zur Herstellung des Zellkulturgefäßes können dadurch minimiert werden, daß es zumindest teilweise im Spritzgußverfahren aus Kunststoff gefertigt ist.

20 Zur Ermöglichung einer visuellen Kontrolle des Zellenwachstums wird ferner vorgeschlagen, daß zumindest der Boden der Züchtungsvertiefungen, vorzugsweise das gesamte Basisteil, noch bevorzugter auch der Deckel, aus einem durchsichtigen Material gefertigt ist.

25 Nach einem weiteren Gesichtspunkt betrifft die Erfindung die Verwendung von einer Mehrzahl von beispielsweise konischen oder kegelstumpfförmigen Vertiefungen aufweisenden Zellkulturschalen zum Züchten von Antitumorzellen für die Gen- und Zelltherapie.

30 Die Erfindung wird nachfolgend mit Bezug auf die beigelegte Zeichnung an Hand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden. Es stellt dar:

- Fig. 1 eine Schnittdarstellung einer ersten Ausführungsform des erfindungsgemäße Zellkulturgefäßes;
- 5 Fig. 2 eine schematische Draufsicht auf das Zellkulturgefäß gemäß Fig. 1;
- Fig. 3 eine Schnittdarstellung einer weiteren Ausführungsform einer Züchtungsvertiefung des Zellkulturgefäßes;
- 10 Fig. 4 bis 6 schematische Draufsichten auf weitere Ausführungsformen des Zellkulturgefäßes; und
- Fig. 7 eine schematische Darstellung einer Separationssäulen-Anordnung, bei welcher ein erfindungsgemäßes Zellkultur-
15 gefäß zum Einsatz kommt.

In Fig. 1 ist ein erfindungsgemäßes Zellkulturgefäß allgemein mit 10 bezeichnet. Das Zellkulturgefäß 10 umfaßt ein Basisteil 12 und einen Deckel
20 14, die vorzugsweise beide aus transparentem Kunststoff gefertigt sind, beispielsweise im Spritzgußverfahren. Das Basisteil 12 und der Deckel 14 weisen in Draufsicht kreisförmigen Querschnitt auf, wie dies in Fig. 2 grobschematisch dargestellt ist.

25 Das Basisteil 12 umfaßt einen zylindrischen Umfangsrand 12a, dessen Unterkante 12b eine Stützebene E zum Abstützen des Zellkulturgefäßes 10 auf einem Untergrund, beispielsweise einem Fach eines Zellzüchtungs-schranks, dient. Selbstverständlich ist hierzu keine vollständig in der Ebene E umlaufende Unterkante 12b erforderlich. Vielmehr genügt es zur stabilen
30 Abstützung des Zellkulturgefäßes 10 auf dem Untergrund, wenn das Zellkulturgefäß wenigstens drei Stützbeine aufweist.

Das Basisteil 12 weist ferner eine die Umfangswandung 12a einseitig verschließende obere Fläche 12c auf, in der im Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 1 und 2 insgesamt vier Züchtungsvertiefungen 16 mit einem Volumen von jeweils mindestens 1 ml ausgebildet sind.

5

In dem dargestellten Ausführungsbeispiel weisen alle Vertiefungen 16 eine Querschnittsfläche auf, die sich von der oberen Fläche 12c des Basisteils zum Boden 16a bzw. 16b der Vertiefung 16 hin verjüngt. Mit dem Wort "verjüngen" ist hierbei gemeint, daß die Querschnittsfläche der Vertiefung 16 mit wachsendem Abstand von der oberen Fläche 12c an keiner Stelle wieder zunimmt, sondern stets abnimmt bzw. allenfalls konstant bleibt, wie dies in Fig. 3 für den bodenfernen Bereich 16c der Vertiefung 16 dargestellt ist. Auch muß die Querschnittsfläche der Vertiefung am Vertiefungsboden nicht zu Null abgenommen haben, sondern es kann eine endliche Bodenfläche vorgesehen sein, wie dies bei den Vertiefungsböden 16a und 16b gemäß Fig. 1 der Fall ist.

10

Auch die Vertiefungen 16 haben vorzugsweise kreisförmigen Querschnitt. Sie verjüngen sich zur Bodenfläche hin vorzugsweise konisch, wobei der in Fig. 1 mit α bezeichnete, halbe Öffnungswinkel des Konus zwischen etwa 30° und 70° beträgt.

15

Der bodennahe Bereich der Vertiefungen 16 ist mit einer Wachstumsstimulatoren für die Anti-Tumor-Zellen umfassenden Beschichtung 18 versehen, welche beispielsweise Tumorzellvesikel umfaßt.

20

Im Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 1 umfaßt der Deckel 14 verschiedene Zugangsstellen 20, 22 und 24 zum Zuführen bzw. Entnehmen von Stoffen aus dem Zellkulturgefäß 10. Gleichwohl versteht es sich, daß derartige Zugangsstellen auch bzw. ausschließlich am Basisteil 12 vorgesehen sein können. Auch unterliegt die Anzahl von Zugangsstellen keiner Beschränkung.

25

Die Zugangsstelle 20 weist einen an dem Deckel 14 einstückig angeformten Rohransatz 20a, eine Gummi-Membrane 20b sowie ein mit dem Rohransatz 20a fest verbundenes, beispielsweise verklebtes Verschlusselement 20c auf. Das Verschlusselement 20c weist in Verlängerung des Lumens 20a1 des Rohransatzes 20a eine Durchbrechung 20c1 auf. Die Verbindung zwischen dem Lumen 20a1 des Rohransatzes 20a und der Durchbrechung 20c1 ist durch die Gummimembrane 20b dicht verschlossen. Über die Zugangsstelle 20 können beispielsweise die zu expandierenden Anti-Tumor-Zellen mittels einer Spritze in das Zellkulturgefäß 10 eingebracht werden. Hierzu ist die Zugangsstelle 20 vorzugsweise über bzw. neben einer der Vertiefungen 16 angeordnet, so daß die Anti-Tumor-Zellen in einfacher Weise in die zu ihrer initialen Expansion bestimmte Vertiefung 16 eingebracht werden können. In Fig. 1 ist dies die in der linken Bildhälfte dargestellte Vertiefung 16'.

Die Vertiefung 16' zur initialen Expansion der Anti-Tumor-Zellen weist eine besonders kleine Bodenfläche 16a auf, so daß die relativ wenigen, anfänglich vorhandenen Anti-Tumor-Zellen im Bereich dieser Bodenfläche 16a relativ dicht nebeneinander liegen, was den Austausch von ihr Wachstum begünstigenden Botenstoffe erleichtert. Zudem wird das spezifische Wachstum der Anti-Tumor-Zellen durch die beispielsweise Tumorzellvesikel umfassende Beschichtung 18 begünstigt. Über die Zugangsstelle 20 kann auch die Nährlösung in dem Zellkulturgefäß 10 erneuert werden.

Haben die Anti-Tumor-Zellen in der Vertiefung 16' sich in einem Maße vermehrt, daß aufgrund ihrer nunmehr vorliegenden Packungsdichte toxische Reaktionen zu befürchten sind, die zum Absterben der Anti-Tumor-Zellen führen würden, so können die Anti-Tumor-Zellen durch einfaches Schütteln des gesamten Zellkulturgefäßes nach vorheriger Zugabe einer ausreichenden Menge an Nährlösung auch auf die anderen Vertiefungen 16 verteilt werden. Diese weisen vorzugsweise eine größere Bodenfläche 16b auf, die so gewählt ist, daß die Anti-Tumor-Zellen auch in den Vertiefungen 16 in einer ihr Anwachsen begünstigenden Zelldichte zu liegen kommen.

Ist die Expansion der Anti-Tumor-Zellen abgeschlossen, so können diese durch einfaches Auf-den-Kopf-Stellen des Zellkulturgefäßes 10 mit einer Beschichtung 26 in Kontakt gebracht werden, die im Deckel 14 vorgesehen ist. Diese Beschichtung 26 kann ebenfalls Wachstumsstimulatoren für die Anti-Tumor-Zellen enthalten. Diese Beschichtung 26 kann jedoch alternativ auch Retroviren zum Markieren der Anti-Tumor-Zellen für einen nachfolgenden Separationsschritt umfassen. Auf diesen Separationsschritt wird nachfolgend im Zusammenhang mit der Beschreibung der Fig. 7 noch näher eingegangen werden.

Zum Anschluß des erfindungsgemäßen Zellkulturgefäßes 10 an eine Separationssäule oder dergleichen dient die Zugangsstelle 24, die einen am Deckel 14 angeformten Rohransatz 24a aufweist. Das Lumen 24a1 des Rohransatzes 24a ist mittels einer aufgeklebten Verschlusskappe 24b abgedichtet, die im Zuge der Verbindung mit einem Verbindungsstutzen, Verbindungsschlauch oder dergleichen zerstört wird. Zur Befestigung des Verbindungsstutzens bzw. Verbindungsschlauchs am Rohransatz 24 ist an letzterem ein Gewinde 24c angeformt.

Es ist jedoch auch möglich, die in der Nährlösung enthaltenen Anti-Tumor-Zellen aus dem Zellkulturgefäß 10 auszugießen. Hierzu weist das Zellkulturgefäß 10 an einem trichterartig zusammenlaufenden Wandungsabschnitt 10a die Zugangsstelle 22 auf. Die Zugangsstelle 22 umfaßt einen Rohransatz 22a sowie ein auf diesen mittels eines Gewindes 22b aufgeschraubtes Verschlüsselement 22c zum Verschließen des Lumens 22a1 des Rohransatzes 22a. Wie man der grobschematischen Darstellung in Fig. 2 entnimmt, kann der trichterartig zusammenlaufende Wandungsabschnitt 10a im Falle eines Zellkulturgefäßes 10 mit kreisförmigem Querschnitt einfach von der Zylinderwandung 14a des Deckels 14 gebildet sein.

Und auch bei einem Zellkulturgefäß mit in Draufsicht polygonalem Querschnitt kann die Polygonform des Zellkulturgefäßes zur Ausbildung des

trichterartigen Wandungsabschnitts genutzt werden, indem man die Zugangsstelle in einer Ecke des Polygons anordnet. So ist beispielsweise in Fig. 4 ein rechteckiges Gefäß 110 dargestellt, bei welchem der Trichter 110a von zwei Begrenzungswandungen des Rechtecks gebildet ist.

5

Gemäß Fig. 5 ist es jedoch ebenso möglich, an einer Seite eines Polygons (im Beispiels gemäß Fig. 5 eines Quadrats) einen zusätzlichen trichterartigen Wandungsabschnitt 210a des Zellkulturgefäßes 210 vorzusehen, an den die Zugangsstelle 222 anschließt.

10

Gemäß Fig. 4 bis 6 unterliegt auch die Zahl der in dem Zellkulturgefäß vorgesehenen Züchtungsvertiefungen keiner Beschränkung. So weist das Zellkulturgefäß 110 gemäß Fig. 4 sechs Vertiefungen 116, das Züchtungsgefäß 210 gemäß Fig. 5 vier Vertiefungen 216 und das Züchtungsgefäß 210 gemäß Fig. 6 sieben Vertiefungen 316 auf. Ferner ist auch eine andere Anzahl von Züchtungsvertiefungen möglich. Ferner kommen auch andere Querschnittsgestalten als die in den Fig. 3 bis 6 dargestellten zur Ausbildung des Zellkulturgefäßes in Frage.

15

20

Nachzutragen ist noch, daß der Deckel 14 und das Basisteil 12 flüssigkeitsdicht miteinander verbunden sind. Da die erfindungsgemäßen Zellkulturgefäße im Hinblick auf die von ihnen ausgehende Kontaminationsgefahr vorzugsweise nach einmaligem Gebrauch als Sondermüll entsorgt werden, wird man das Basisteil 12 und den Deckel 14 vorzugsweise untrennbar miteinander verbinden, beispielsweise durch Verschweißen, insbesondere Ultraschallverschweißen, oder Verkleben, wie dies in der rechten Bildhälfte von Fig. 1 bei 30 angedeutet ist. Es ist jedoch auch möglich, das Basisteil 12 und den Deckel 14 miteinander zu verschrauben, wie dies in der linken Bildhälfte der Fig. 1 bei 32 dargestellt ist.

25

30

Nachzutragen ist ferner, daß auch die Zugangsstelle 20 vorzugsweise an der zylindrischen Umfangswandung 14a des Deckels angeordnet ist, um so

ein Stapeln der Zellkulturgefäße in einem Züchtungsschrank zu ermöglichen.

In Fig. 7 ist eine Anordnung zur Abtrennung der expandierten Anti-Tumor-
5 Zellen von dem unerwünschten Störhintergrund unspezifischer Zellen dargestellt. Hierzu ist ein erfindungsgemäßes Zellkulturgefäß über seine Zugangsstelle 24 mit einer Separationssäule 34 verbunden, an die sich nach einem Wegeventil 36 eine handelsübliche Zellkulturflasche 38 bzw. ein Auffangbehälter 40 für Flüssigabfälle anschließt. Der mit einer Schraub-
10 kappe 34a versehene Zugangsstutzen 34b der Separationssäule 34 ist dabei derart bemessen, daß er die Membrane 24e der Zugangsstelle 24 erst dann zerstört, wenn die Schraubkappe 34a mit dem Gewinde 24c in Dichtungseingriff getreten ist. Entsprechendes gilt auch für die Anschlußstelle 42 der herkömmlichen Zellkulturflasche 38.

15

Der Separationsprozeß in der Separationssäule 34 ist im dargestellten Ausführungsbeispiel so ausgelegt, daß die Separationssäule 34 die markierten Anti-Tumor-Zellen in die Zellkulturflasche 38 passieren läßt und die nicht markierten Zellen des Störhintergrunds in der Separationssäule 34
20 zurückhält. Nach erfolgter Separation können die Anti-Tumor-Zellen in der Zellkulturflasche 38 weiter expandiert werden, bis die für ein Anti-Tumor-Transplantat erforderliche Anzahl von Anti-Tumor-Zellen erhalten worden ist. Selbstverständlich ist es auch möglich, ausgangsseitig der Separationssäule 34 anstelle der Kulturflasche 38 wiederum ein erfindungsgemäßes
25 Zellkulturgefäß 10 anzuordnen.

Obgleich in Fig. 7 die Verbindungen zwischen dem Zellkultur-gefäß 10 und der Separationssäule, zwischen der Separations-säule und der Zellkultur-
30 flasche 38 bzw. dem Abfallbehälter 40 als starre Verbindungen dargestellt sind, versteht es sich, daß diese Verbindungen gewünschtenfalls auch flexible Verbindungen sein können, bspw. Verbindungsschläuche umfassen können. In diesem Fall kann dann beispielsweise an dem Zellkulturgefäß 10

eine Lasche 10b vorgesehen sein, um dieses an einem Haken 44 aufhängen zu können. Entsprechendes gilt selbstverständlich auch für die Separations säule 34, die Zellkulturflasche 38 und den Abfallbehälter 40.

- 5 Nachzutragen ist noch, daß das erfindungsgemäße Zellkultur-gefäß gaspermeabel ausgebildet ist, um ein "Atmen" der Zellen zu ermöglichen. Diese Gaspermeabilität kann beispielsweise eine Eigenschaft des zur Fertigung des Deckels und/oder des Basisteils verwendeten Materials sein. Beispielsweise kann die Verschlusssmembrane 24b gaspermeabel ausgebildet sein.
- 10 Zusätzlich oder alternativ kann aber auch an dem Zellkulturgefäß ein handelsüblicher Sterilfilter angebracht sein.

- Nachzutragen ist ferner, daß die Trennstege 12d (siehe Fig. 1) zwischen den einzelnen Züchtungsvertiefungen 16 vorzugsweise schmal bemessen
- 15 sind. Dies hat zum einen den Vorteil, daß das Verhältnis des zur Verfügung stehenden Züchtungsvolumens zum Gesamtvolumen des erfindungsgemäßen Züchtungsgefäßes einen hohen Wert aufweist, das Volumen des Züchtungsgefäßes also effizient ausgenutzt wird. Zum anderen lagert sich hierdurch nach dem Schütteln des Züchtungsgefäßes zur Verteilung der
- 20 Anti-Tumor-Zellen von der initialen Züchtungsvertiefung auf sämtliche Züchtungsvertiefungen nur eine vernachlässigbar geringe Anzahl von Zellen auf diesen Trennstegen und nicht in einer der Züchtungsvertiefungen ab. Ist die Konizität der Wandungen der Züchtungsvertiefungen bis in den Bereich der Trennstege fortgesetzt bzw. verlaufen die Trennstege relativ zur Stützebene E mit einer gewissen Neigung, wie dies in Figur 3 bei 12d' angedeu-
- 25 tet ist, so kann die Ablagerung von Zellen auf den Trennstegen vermindert, wenn nicht gar vollständig verhindert werden.

Patentansprüche

- 5 1. Zellkulturgefäß (10) zum Züchten eines Anti-Tumor-Zellen-Transplantats für die Gen- und Zelltherapie, umfassend:
- ein Basisteil (12)
 - mit einer Mehrzahl von Stützstellen (12b), welche eine
 - 10 Stützebene (E) zum Abstützen des Zellkulturgefäßes (10) auf einem im wesentlichen planen Untergrund aufspannen, sowie
 - mit einer zur Stützebene (E) im wesentlichen parallel verlaufenden oberen Fläche (12c), in der eine Mehrzahl von Züchtungsvertiefungen (16) ausgebildet ist, und
 - 15 einen Deckel (14) zum Abdecken des Basisteils (12),
- dadurch gekennzeichnet,**
- daß sich wenigstens eine Züchtungsvertiefung (16) von der oberen Fläche (12c) des Basisteils (12) zum Vertiefungsboden (16a, 16b) hin verjüngt, d.h. daß die Querschnittsfläche dieser
 - 20 Vertiefung (16) von der oberen Fläche (12c) des Basisteils (12) zum Boden (16a, 16b) hin derart abnimmt, daß sich die Zellen bei ihrer Vermehrung nicht nur nach oben, sondern auch in Querrichtung ausbreiten können,
 - daß jede der Züchtungsvertiefungen (16) ein Volumen von
 - 25 wenigstens 1 ml aufweist, und
 - daß das Basisteil (12) und der Deckel (14) flüssigkeitsdicht miteinander verbindbar sind.
- 30 2. Zellkulturgefäß nach Anspruch 1,
- dadurch gekennzeichnet,** daß die Bodenflächen (16a, 16b) der Züchtungsvertiefungen (16) unterschiedlich groß bemessen sind.

3. Zellkulturgefäß nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens zwei Züchtungsvertiefungen (16), vorzugsweise alle Züchtungsvertiefungen (16), sich zu ihrem Boden (16a, 16b) hin verjüngend ausgebildet sind.

5

4. Zellkulturgefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet, daß die Querschnittsfläche der Vertiefungen (16) zumindest über einen Teil der Höhe der Vertiefung (16) zum Boden (16a, 16b) hin monoton abnimmt.

10

5. Zellkulturgefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet, daß die Querschnittsfläche ferner stetig abnimmt.

15

6. Zellkulturgefäß nach Anspruch 4 oder 5,
dadurch gekennzeichnet, daß die Vertiefungen (16) konisch oder kegelstumpfförmig ausgebildet sind.

20

7. Zellkulturgefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet, daß der Winkel (α), den die schrägen Begrenzungsflächen der Vertiefungen (16) mit der Vertikalen einschließen, zwischen etwa 30° und etwa 70° beträgt.

25

8. Zellkulturgefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 7,
dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine der Vertiefungen (16) zumindest teilweise, vorzugsweise im Bereich ihres Bodens (16a, 16b), mit wenigstens einem die Zellvermehrung begünstigenden Stoff (18) beschichtet ist.

30

9. Zellkulturgefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 8,
dadurch gekennzeichnet, daß eine Innenfläche des Deckels (14) mit
wenigstens einem die Zellvermehrung begünstigenden bzw. einem
die vermehrten Anti-Tumor-Zellen markierenden Stoff (26) beschich-
tet ist.
10. Zellkulturgefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet, daß der Deckel (14) mit dem Basisteil (12)
stoffschlüssig verbunden ist (bei 30), beispielsweise durch Verkle-
ben, Verschweißen oder dergleichen.
11. Zellkulturgefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 10,
dadurch gekennzeichnet, daß der Deckel (14) mit dem Basisteil (12)
verschraubbar ist (bei 32).
12. Zellkulturgefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 11,
dadurch gekennzeichnet, daß es in Draufsicht kreisförmig ausgebil-
det ist (Fig. 2 und 6).
13. Zellkulturgefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 12,
dadurch gekennzeichnet, daß es in Draufsicht rechteckig oder qua-
dratisch ausgebildet ist (Fig. 4 und 5).
14. Zellkulturgefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 13,
dadurch gekennzeichnet, daß der Deckel (14) oder/und das Basisteil
(12) wenigstens eine Zugangsstelle (20, 22, 24), vorzugsweise
mehrere Zugangsstellen, zum Zugeben bzw. zum Entnehmen von
Stoffen in das Gefäß (10) bzw. aus dem Gefäß (10) aufweist.

15. Zellkulturgefäß nach Anspruch 14,
dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine der Zugangsstellen
(20) einer der Züchtungsvertiefungen (16') benachbart angeordnet
ist.
- 5
16. Zellkulturgefäß nach Anspruch 14 oder 15,
dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine der Zugangsstellen
(20) eine Öffnung (20a1) aufweist, welche mittels einer aus Gummi-
material bzw. gummi-artigem Material gebildeten Membrane (20b)
verschlossen ist.
- 10
17. Zellkulturgefäß nach einem der Ansprüche 14 bis 16,
dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens eine der Zugangsstellen
(22) eine mittels eines Schraubverschlusses (20b/20c) verschließbare
Öffnung (22a1) aufweist.
- 15
18. Zellkulturgefäß nach einem der Ansprüche 14 bis 17,
dadurch gekennzeichnet, daß der Deckel (14) alleine oder das Ba-
sisteil (12) alleine oder Deckel (14) und Basisteil (12) gemeinsam
einen trichter-artig zusammenlaufenden Wandungsbereich (10a)
festlegen, dessen Mündungsöffnung die Zugangsstelle (22) zugeord-
net ist.
- 20
19. Zellkulturgefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 18,
dadurch gekennzeichnet, daß der Deckel (14) oder/und das Basisteil
(12) wenigstens eine Anschlußstelle (24) für ein weiteres Behand-
lungsgerät (34) aufweist.
- 25
20. Zellkulturgefäß nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet, daß die Anschlußstelle (24) eine mittels
einer Membrane (24b) verschlossene Öffnung (24a1) aufweist und
derart ausgebildet ist, daß die Membran (24b) beim Anschließen des
- 30

- 21 -

weiteren Behandlungsgeräts (34) erst nach Herstellung einer zur Umgebung hin flüssigkeitsdichten Verbindung zwischen dem Zellkulturgefäß (10) und dem weiteren Behandlungsgerät (34) zerstört wird.

5

21. Zellkulturgefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 20,
dadurch gekennzeichnet, daß es gaspermeabel ausgebildet ist.

10

22. Zellkulturgefäß nach Anspruch 21,
dadurch gekennzeichnet, daß es wenigstens eine mittels einer gaspermeablen Membrane (24b) verschlossene Öffnung (24a1) aufweist.

15

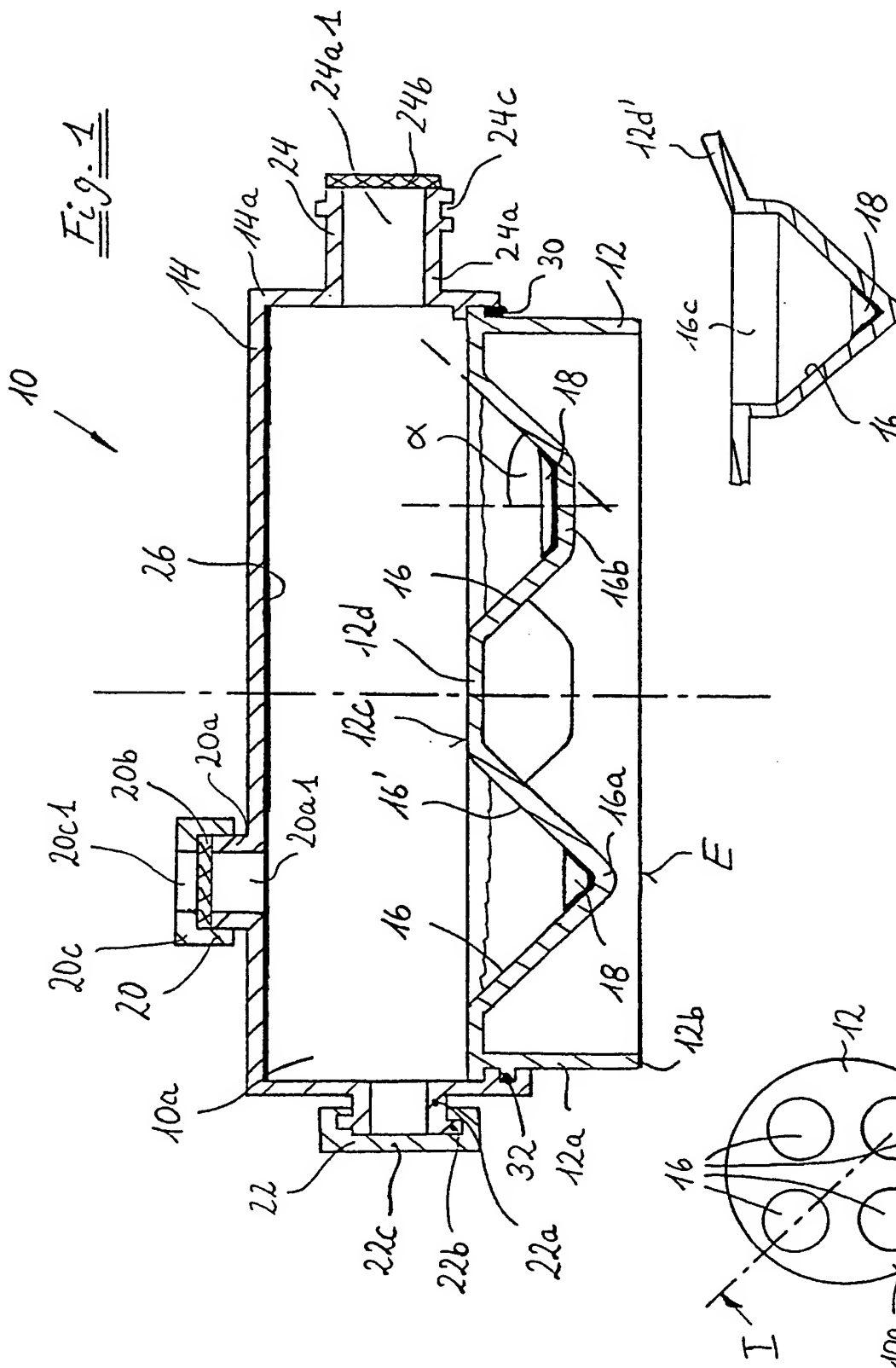
23. Zellkulturgefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 22,
dadurch gekennzeichnet, daß es zumindest teilweise im Spritzgußverfahren aus Kunststoff gefertigt ist.

20

24. Zellkulturgefäß nach einem der Ansprüche 1 bis 23,
dadurch gekennzeichnet, daß das Basisteil (12) zumindest im Bereich der Böden (16a, 16b) der Züchtungsvertiefungen (16), vorzugsweise das gesamte Basisteil (12), noch bevorzugter auch der Deckel (14), aus durchsichtigem Material gefertigt ist.

25

25. Verwendung von eine Mehrzahl von beispielsweise konischen oder kegelstumpfförmigen Vertiefungen (16) aufweisenden Zellkulturschalen (10), gewünschtenfalls nach einem der Ansprüche 1 bis 24, zum Züchten eines Anti-Tumor-Zellen-Transplantats für die Gen- und Zelltherapie.

Fig. 3Fig. 2

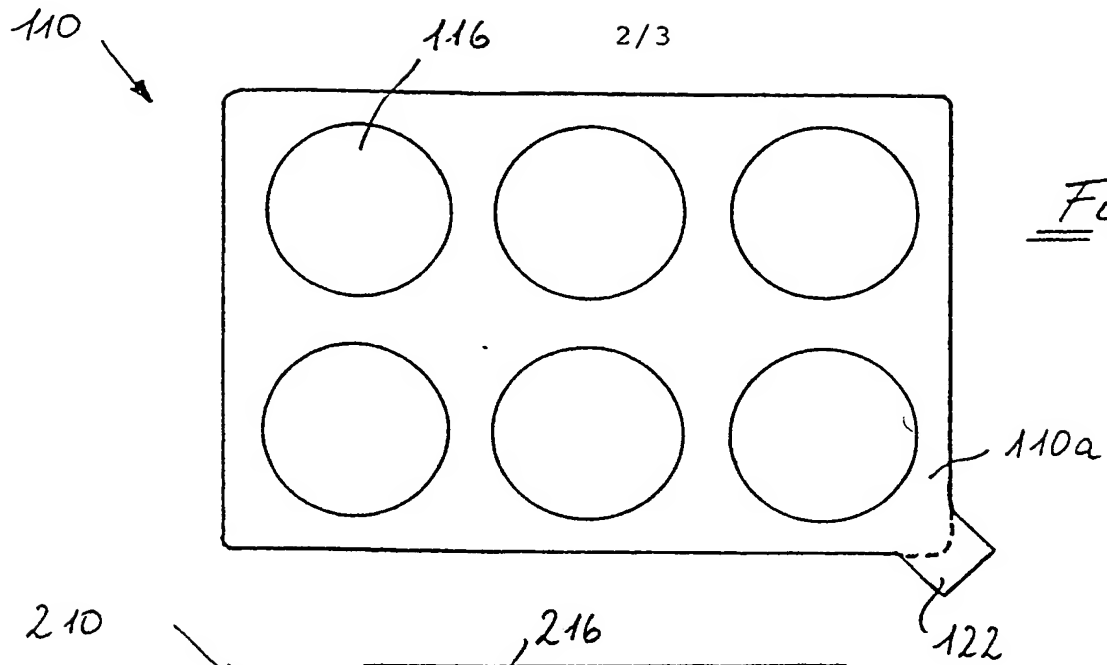


Fig. 4

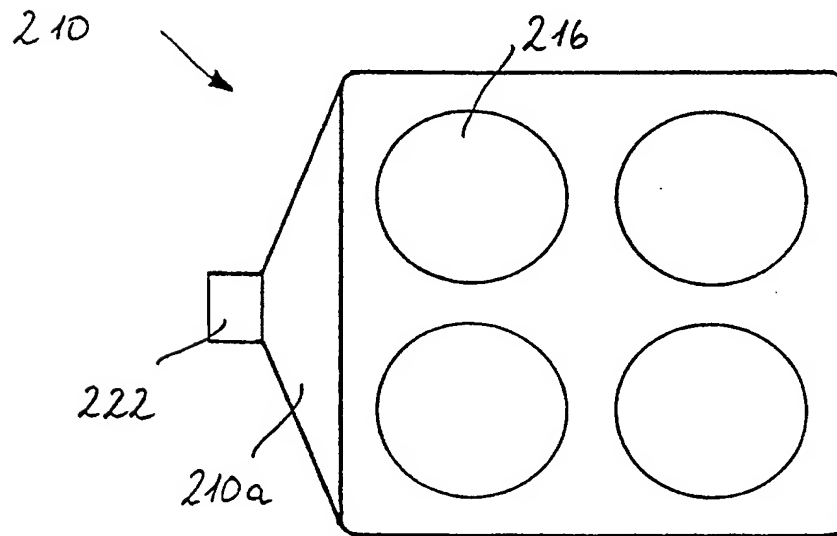


Fig. 5

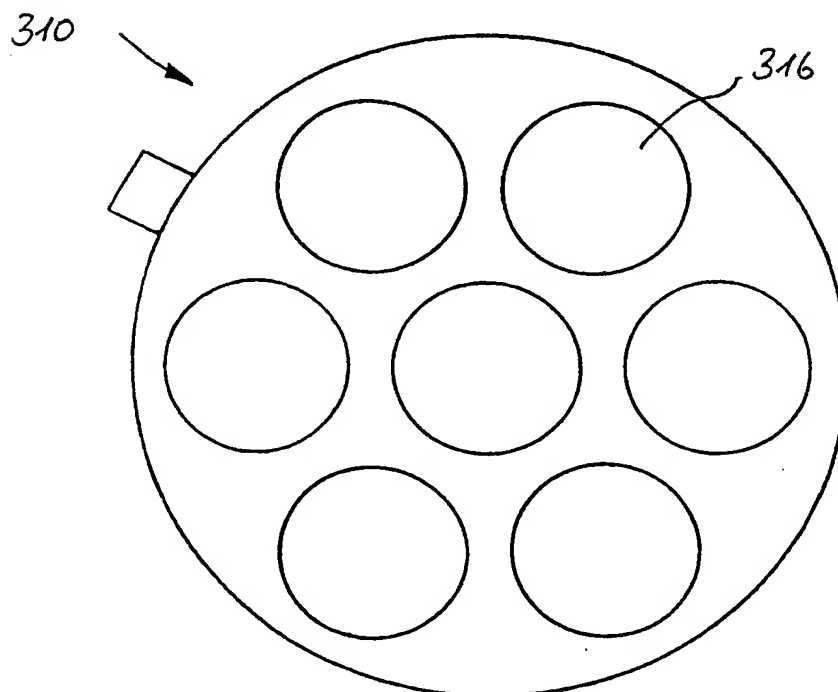
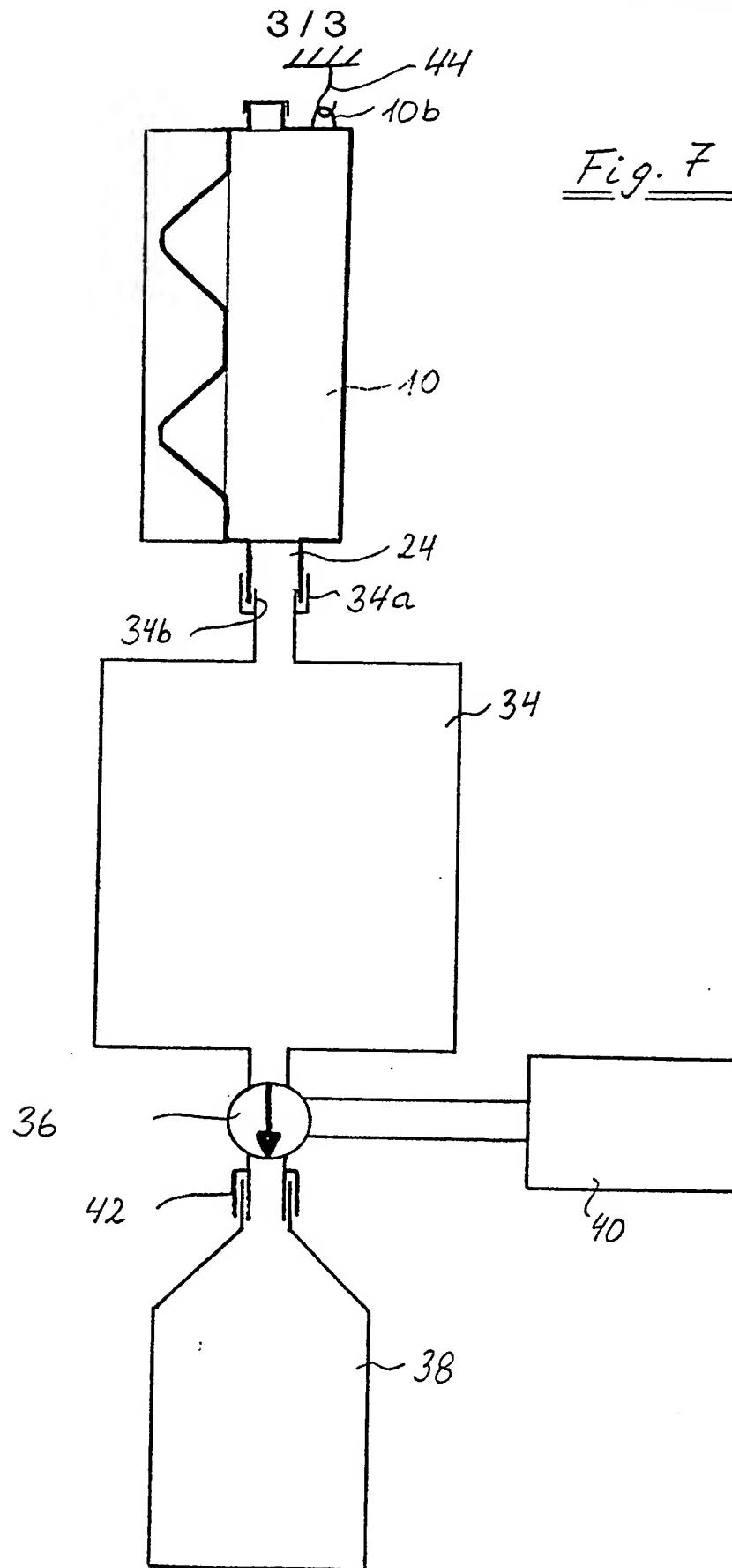


Fig. 6



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/07095

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12M1/20 C12M1/24 B01L3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12M B01L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 27196 A (SANADI ASHOK R) 12 October 1995	1,3-7, 13,23-25
Y	see page 11, paragraph 3 - page 13; claims 1,2,5,6; figure 1	1,2,8, 10,14, 16,17
Y	WO 91 13638 A (SMITH & NEPHEW) 19 September 1991 see figures	1,10,14, 16,17
Y	FR 2 686 618 A (NICOLOFF THIERRY) 30 July 1993 see figure 3	1,2
A	US 5 229 163 A (FOX WILLIAM A) 20 July 1993 see figures 1,4,5	1,3-6
	--- -/-- ---	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 April 1998

Date of mailing of the international search report

29/04/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Coucke, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/07095

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 329 579 A (API SYSTEM) 23 August 1989 see figures ----	1,3-6
A	WO 83 00047 A (AMERICAN MICRO SCAN INC) 6 January 1983 see figure 2 ----	1,3-6
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 013, no. 236 (C-602), 30 May 1989 & JP 01 047371 A (TERUMO CORP), 21 February 1989, see abstract; figure 2 -----	1,8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/07095

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9527196 A	12-10-1995	AU 2122395 A	23-10-1995
WO 9113638 A	19-09-1991	AT 139685 T	15-07-1996
		AU 649656 B	02-06-1994
		AU 7348591 A	10-10-1991
		CA 2065432 A	06-09-1991
		DE 69120527 D	01-08-1996
		DE 69120527 T	16-01-1997
		EP 0518920 A	23-12-1992
		EP 0681846 A	15-11-1995
		ES 2089195 T	01-10-1996
		GB 2252562 A, B	12-08-1992
		JP 5504497 T	15-07-1993
		US 5712137 A	27-01-1998
FR 2686618 A	30-07-1993	AU 3503393 A	01-09-1993
		EP 0625189 A	23-11-1994
		WO 9315183 A	05-08-1993
US 5229163 A	20-07-1993	US 5041266 A	20-08-1991
EP 0329579 A	23-08-1989	FR 2627191 A	18-08-1989
		DE 68910708 D	23-12-1993
		DE 68910708 T	10-03-1994
		ES 2047144 T	16-02-1994
		JP 1243983 A	28-09-1989
		US 5180555 A	19-01-1993
WO 8300047 A	06-01-1983	AU 8738082 A	18-01-1983
		EP 0082194 A	29-06-1983
		JP 58500972 T	23-06-1983

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES IPK 6 C12M1/20 C12M1/24 B01L3/00		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) IPK 6 C12M B01L		
Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 27196 A (SANADI ASHOK R) 12. Oktober 1995	1,3-7, 13,23-25
Y	siehe Seite 11, Absatz 3 - Seite 13; Ansprüche 1,2,5,6; Abbildung 1	1,2,8, 10,14, 16,17
Y	WO 91 13638 A (SMITH & NEPHEW) 19. September 1991 siehe Abbildungen	1,10,14, 16,17
Y	FR 2 686 618 A (NICOLOFF THIERRY) 30. Juli 1993 siehe Abbildung 3	1,2
A	US 5 229 163 A (FOX WILLIAM A) 20. Juli 1993 siehe Abbildungen 1,4,5	1,3-6
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen	<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie	
<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts	
22. April 1998	29/04/1998	
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Coucke, A	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ¹	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	EP 0 329 579 A (API SYSTEM) 23.August 1989 siehe Abbildungen ----	1,3-6
A	WO 83 00047 A (AMERICAN MICRO SCAN INC) 6.Januar 1983 siehe Abbildung 2 ----	1,3-6
Y	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 013, no. 236 (C-602), 30.Mai 1989 & JP 01 047371 A (TERUMO CORP), 21.Februar 1989, siehe Zusammenfassung; Abbildung 2 -----	1,8

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/07095

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9527196	A	12-10-1995	AU	2122395 A	23-10-1995
WO 9113638	A	19-09-1991	AT	139685 T	15-07-1996
			AU	649656 B	02-06-1994
			AU	7348591 A	10-10-1991
			CA	2065432 A	06-09-1991
			DE	69120527 D	01-08-1996
			DE	69120527 T	16-01-1997
			EP	0518920 A	23-12-1992
			EP	0681846 A	15-11-1995
			ES	2089195 T	01-10-1996
			GB	2252562 A, B	12-08-1992
			JP	5504497 T	15-07-1993
			US	5712137 A	27-01-1998
FR 2686618	A	30-07-1993	AU	3503393 A	01-09-1993
			EP	0625189 A	23-11-1994
			WO	9315183 A	05-08-1993
US 5229163	A	20-07-1993	US	5041266 A	20-08-1991
EP 0329579	A	23-08-1989	FR	2627191 A	18-08-1989
			DE	68910708 D	23-12-1993
			DE	68910708 T	10-03-1994
			ES	2047144 T	16-02-1994
			JP	1243983 A	28-09-1989
			US	5180555 A	19-01-1993
WO 8300047	A	06-01-1983	AU	8738082 A	18-01-1983
			EP	0082194 A	29-06-1983
			JP	58500972 T	23-06-1983